

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 G01N 33/564, 33/53	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/14231 (43) 国際公開日 1995年5月26日 (26.05.95)
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01929 (22) 国際出願日 1994年11月15日(15. 11. 94) (30) 優先権データ 特願平5/309874 1993年11月16日(16. 11. 93) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) ヤマサ醤油株式会社 (YAMASA CORPORATION) (JP/JP) 〒288 千葉県銚子市新生町2丁目10番地の1 Chiba, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 松浦栄次 (MATSUURA, Eiji) (JP/JP) 〒288 千葉県銚子市上野町285番地の24 Chiba, (JP) 永江尚人 (NAGAE, Hisato) (JP/JP) 〒288 千葉県銚子市落川町4-651 Chiba, (JP) 五十嵐 誠 (IGARASHI, Makoto) (JP/JP) 五十嵐佳子 (IGARASHI, Yoshiko) (JP/JP) 〒288 千葉県銚子市新生町2丁目15番地の23 Chiba, (JP) 小池隆夫 (KOIKE, Takao) (JP/JP) 〒060 北海道札幌市中央区北二条西18丁目1-2 Hokkaido, (JP) (74) 代理人 弁理士 浅村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title : METHOD OF ASSAYING ANTIPHOSPHOLIPID ANTIBODY AND KIT THEREFOR (54) 発明の名称 抗リン脂質抗体の測定法及びキット <div data-bbox="633 1260 1055 1701"> </div> (57) Abstract <p>A method of assaying an antiphospholipid antibody contained in a sample by using β2-glycoprotein I, wherein use is made of, instead of the same, a polypeptide having the same amino acid sequence as that of the domain IV of β2-glycoprotein I or a polypeptide which is partially different from the above polypeptide but is equivalent thereto in function, thereby permitting an easy and accurate assay of an autoantibody originating in antiphospholipid antibody syndrome.</p>		

(57) 要約

β2-グリコプロテイン I を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、β2-グリコプロテイン I の代わりに、β2-グリコプロテイン I 中のドメイン IV と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することにより、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の簡便でかつ正確な測定が可能となる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バベラ	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロベニア
BG	ブルガリア	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロバキア共和国
BJ	ベナン	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャド
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CF	中央アフリカ共和国	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TH	タイ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ネジエール	UA	ウクライナ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CN	中国	KR	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	US	米国
CZ	チェコ共和国	KZ	大韓民国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド	VN	ベトナム
DK	デンマーク			RO	ルーマニア		

明 細 書

抗リン脂質抗体の測定法及びキット

5 技術分野

本発明は、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法を実施するためのキットに関し、より詳細には $\beta 2$ -グリコプロテイン I を使用する代わりに、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I の特定のドメインと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴としたものである。

背景技術

抗リン脂質抗体の一種である抗カルジオリピン抗体の測定法としては、HarrisらによるRIA法 (Lancet, iii: 1211, 1983)、小池らのELISA法 (Clin. Exp. Immunol., 56:193, 1984) などの方法が報告されている。

しかし、上述の方法は、抗カルジオリピン抗体を正確に定量できなかったり、感染症由来の抗体と抗リン脂質抗体症候群由来の抗体とを区別して測定できないといった問題を有し、必ずしも満足できるものではなかった。

松浦らは、抗リン脂質抗体症候群由来の抗カルジオリピン抗体は固相化したカルジオリピンを認識するのではなく、カルジオリピンと $\beta 2$ -グリコプロテイン I ($\beta 2$ -GP I) (別名: アポリポプロテイン H または抗カルジオリピンコファクター) との複合体を認識することを見

い出すとともに、この原理を利用して、上述の従来法の問題点を克服しうる抗リン脂質抗体の測定法を開発した (Lancet, 336:177, 1990、臨床免疫, 22(Suppl. 15):170, 1990、W091/06006、J. Immunol., 148: 3855, 1992)。

- 5 さらに、松浦らのその後の研究により、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体（従来、抗カルジオリピン抗体と呼ばれていたもの）は、カルジオリピンそのものに反応するのではなく、カルジオリピン固相化プレートのよ
10 うな、酸素原子が存在する疎水表面と相互作用することにより構造変化した $\beta 2$ -G P I を認識する抗体であることを明らかにし (J. Exp. Med., 179, 457-462, (1994)、
感染・炎症・免疫, 23, 9(1993))、この原理を応用して、
従来のようにカルジオリピンなどのリン脂質を使用することなく、極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -G P I だ
15 けを結合させた固相試薬を用いて抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体を測定する方法も開発した (W093/16387)。

- 一方、 $\beta 2$ -G P I は公知の糖タンパク質であり、その
アミノ酸配列及び塩基配列も既に明らかにされているが
20 (Int. Immunol., 3, 1217-1221(1991)、Biochem. J., 277, 387(1991)、Gene, 108, 293(1991))、(1) その分子内にシステイン-システイン結合 (S-S 結合) が 1
1 個存在し、五つのドメインから構成される " スドドメイン " と呼ばれる特徴ある 1 次構造を持っていること
25 (第 1 図参照)、(2) $\beta 2$ -G P I は成熟蛋白の N 末端

側に19個のアミノ酸から成るペプチドが付随した前駆体蛋白としてコードされており、発現された前駆体蛋白の余分なペプチドは分泌時に切断されること、などの理由から通常の大腸菌や酵母による発現系ではプロセッシング、システイン同士の結合などの発現後の蛋白の修飾が正確に行われず、活性を有する $\beta 2$ -G P Iを発現させることは困難であると考えられていた。

しかしながら、最近、五十嵐らは、バキュロウイルス発現系を用いることにより上記問題を克服できることを見いだし、バキュロウイルス発現系を用いて製造された組換え $\beta 2$ -G P Iが、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定に利用できることを報告している (Clin. Exp. Immunol., 93, 19 (1993)、特願平4-152619号)。

上述したように、 $\beta 2$ -G P Iが抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定に必要不可欠なタンパク質であることが疑いようのない事実であることは明らかにされたものの、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の臨床的意義については依然として未だに不明な点が多い。したがって、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の $\beta 2$ -G P Iとの反応性を明らかにすることは、抗リン脂質抗体症候群の発症メカニズムの解明、及びより簡便な測定系の確立などにもつながりうることであり、今後の重要課題と考えられている。

25 発明の開示

本発明者らは、五つのドメインから構成される $\beta 2$ -G P Iの各ドメインの抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定上の機能を解明すべく、特定のドメインを欠落させた変異タンパク質（該変異タンパク質を「欠失変異タンパク質（deleted mutant protein）」または「ドメイン欠失変異タンパク質（domain deleted mutant protein）」という）を作製し、ドメイン欠失変異タンパク質と抗体との反応性を解析した結果、①第1図に示される $\beta 2$ -G P Iの第5ドメイン（ドメインV）にリン脂質との結合部位が存在すること、②抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）は第4ドメイン（ドメインIV）を中心とする構造であること、③このエピトープは通常隠れているが、ドメインVがリン脂質など結合することにより、構造変化を起こして抗体が認識できるようになることなどを見いだした。

本発明者らは、これらの知見を抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の測定への応用に関してさらに研究を重ね、本発明を完成させた。

従って、本発明は、 $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法

に使用するキットに関するものである。

また、本発明は、担体にリン脂質を結合させた固相試薬と $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

10 さらに、本発明は、担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

さらにまた、本発明は、極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体

20

25

の測定法及び該方法に使用するキットに関するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、ヒト血清由来 $\beta 2$ -G P I (I-V)の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第2図は、ドメイン欠失変異蛋白(I-IV)の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第3図は、ドメイン欠失変異蛋白(I-III)の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

10 第4図は、ドメイン欠失変異蛋白(II-V)の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第5図は、ドメイン欠失変異蛋白(III-V)の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

15 第6図は、ドメイン欠失変異蛋白(IV-V)の一次構造ならびに、各ドメインの位置を示したものである。

第7図は、本発明方法で得られた各ドメイン欠失変異蛋白の精製標品のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(クマシーブルー染色)による分析の結果を示したものである。

20 第8図は、本発明方法で得られた各ドメイン欠失変異蛋白とマウス抗ヒト $\beta 2$ -G P Iモノクローナル抗体の反応性をELISA法にて比較したものである。

第9図は、第8図に示した結果より判明したマウス抗ヒト $\beta 2$ -G P Iモノクローナル抗体に対する $\beta 2$ -G P I
25 の抗原決定基を解析したものである。

第10図は、各ドメイン欠失変異蛋白とS-プレートを用いたELISA法により、抗カルジオリピン抗体（抗CL抗体）の抗原決定基を検討したのものである。

第11図は、各ドメイン欠失変異蛋白とC-プレートを用いたELISA法により、抗CL抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第12図は、各ドメイン欠失蛋白とS-プレートを用いたELISA法により、健常人血清中の抗CL抗体の抗原決定基を検討したのものである。

10 第13図は、各ドメイン欠失蛋白とS-プレートを用いたELISA法により、SLE患者血清中の抗CL抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第14図は、各ドメイン欠失蛋白とS-プレートを用いたELISA法により、梅毒患者血清中の抗CL抗体
15 の抗原決定基を検討したのものである。

第15図は、各ドメイン欠失蛋白とC-プレートを用いたELISA法により、健常人血清中の抗CL抗体の抗原決定基を検討したのものである。

第16図は、各ドメイン欠失蛋白とC-プレートを用いたELISA法により、SLE患者血清中の抗CL抗体
20 の抗原決定基を検討したのものである。

第17図は、各ドメイン欠失蛋白とC-プレートを用いたELISA法により、梅毒患者血清中の抗CL抗体の抗原決定基を検討したのものである。

25 第18図は、各ドメイン欠失蛋白ならびにカルジオリ

ピン固相プレートを用いたELISA法により、 $\beta 2$ -GPIの抗カルジオリピン抗体の抗原決定基を検討したものである。

第19図は、各ドメイン欠失変異蛋白、カルジオリピン固相プレートおよび抗 $\beta 2$ -GPI抗体を用いたELISA法により、 $\beta 2$ -GPIのカルジオリピンに対する結合部位の検討結果を示したものである。なお、第10～19図におけるBLはブランクを示す。

第20図は、各ドメイン欠失変異蛋白とヒト血清由来の $\beta 2$ -GPIを用いた競合法により、 $\beta 2$ -GPIのカルジオリピンへの結合部位の検討結果を示したものである。発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳述する。

1) 定義

15 本明細書において、特にことわらない限り、以下の用語は下記の定義のとおりである。

「抗リン脂質抗体」とは、抗リン脂質抗体症候群（SLEに代表される自己免疫疾患、あるいは血栓症、神経症、習慣性流産、血小板減少などの症状を呈する一
20 群の疾患）の患者血清中に出現する自己抗体を意味する。

「 $\beta 2$ -GPI中のドメイン」とは、 $\beta 2$ -GPI中の構造上一つのまとまりを示す領域を意味し、図1示すように、ヒト $\beta 2$ -GPIは五つのドメインを有しており、N末から順番にドメインI、ドメインII、ドメインIII、ドメインIV及びドメインVと命名されている。
25

「 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド」とは、 $\beta 2$ -G P I がヒト由来のものである場合には、第 1 図に示される 1 8 6 番目のシステイン残基から 2 4 1 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有するポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチド」とは、 $\beta 2$ -G P I がヒト由来のものである場合には、第 1 図に示される 1 8 6 番目のシステイン残基から 3 2 6 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有するポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド」とは、 $\beta 2$ -G P I がヒト由来のものである場合には、第 1 図に示される 1 8 6 番目のシステイン残基から 2 4 1 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を少なくとも含有し、かつ 2 4 5 番目のシステイン残基から 3 2 6 番目のシステイン残基までアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含んでいないポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。

「部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチド」とは、たとえば、ポリペプチド中のヒト $\beta 2$ -G P I のドメインと同一のアミノ酸配列を有している部分が、

アミノ酸の欠除、置換及び／または追加によりアミノ酸配列が部分的に相違していても、抗リン脂質抗体の測定においては差異を及ぼさないようなポリペプチド（またはタンパク質）を意味する。このようなポリペプチドとしては、ヒト以外のウシ、ブタなどの各種動物、特に哺乳動物に由来する $\beta 2$ -G P Iの特定のドメインと同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを例示することができる。

2) 本発明方法及びキット

10 本発明方法は、 $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用すること
15 を特徴とするものである。このような本発明方法の具体的な態様は、下記の三つに分類される。

①方法 1 :

担体にリン脂質を結合させた固相試薬と $\beta 2$ -G P Iを利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -G P Iの代わりに、 $\beta 2$ -G P I中のドメイン I Vとドメイン Vと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

②方法 2 :

25 担体に $\beta 2$ -G P Iを結合させた固相試薬を利用してサ

サンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、
β 2-G P I の代わりに、β 2-G P I 中のドメイン I V と
同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一の
アミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと
5 部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを
使用する方法。

③方法 3 :

極性基を表面に導入した担体に β 2-G P I を結合させ
た固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測
10 定する方法において、β 2-G P I の代わりに、β 2-
G P I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸
配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違
していても機能的に同等なポリペプチドを使用する方法。

(1) 本発明の方法 1 及びそれに使用するキット

15 本発明の方法 1 は、β 2-G P I 中のドメイン V にリン
脂質との結合部位が存在すること、抗リン脂質抗体症候
群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部
位）はドメイン I V を中心とする構造であること、及び
このエピトープは通常隠れているが、ドメイン V がリン
20 脂質など結合することにより構造変化を起こし、抗体が
認識できるようになるという知見を利用したものであり、
担体にリン脂質を結合させた固相試薬と β 2-G P I 中の
ドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有
するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても
25 機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とし

ている。

リン脂質としては、陰性荷電を有するものであれば特に限定されない。具体的には、カルジオリピン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジル酸などのグリセロリン脂質を例示することができる。

リン脂質を結合させる担体としては、リン脂質を結合できるものであれば特に限定されない。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレンー無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂を例示することができる。担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じて適当な形状の担体を適宜選択すればよい。

リン脂質と担体との結合は、物理的吸着法、イオン結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法 1 に使用するポリペプチドは、 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドであり、該ポリペプチドにおける $\beta 2$ -G P I とは、哺乳動物由来の $\beta 2$ -G P

I, を例示することができ、特に第 1 図に示されるヒト $\beta 2$ -G P I を好適なものとして例示することができる。

このようなポリペプチドは、ポリメラーゼ鎖反応法 (polymerase chain reaction ; P C R 法) を用いてヒト $\beta 2$ -G P I 中の必要なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させて目的とするポリペプチド (タンパク質) を生産する方法により取得することができる。

10 ヒト $\beta 2$ -G P I の c D N A ライブラリーは、ヒト肝癌細胞である H e p G 2 細胞などを用いて常法により調製することができる。また、H e p G 2 細胞の c D N A ライブラリーは既に市販されており、この市販品を原料として使用することもできる (カタログナンバー 9 3 5 2 0 2 ; 製造 : ストラタジーン社, 販売 : フナコシ (株)) 。さらに、上述したようにヒト $\beta 2$ -G P I の全塩基配列は既に報告されており (Int. Immunol., 3, 1217-1221(1991)、Biochem. J., 277, 387(1991)、Gene, 108, 293(1991))、この配列に基づき化学的に合成して
20 もかまわない。

このようなヒト $\beta 2$ -G P I の c D N A ライブラリーを用い、P C R 法によりドメイン I V とドメイン V を少なくとも含む遺伝子を調製する。P C R 法による目的とする遺伝子の調製は周知であり、その具体的一例は実施例
25 に記載したとおりである。また、調製した遺伝子中に翻

訳開始コドン及び／または翻訳終始コドンが存在しない場合にはそれらのコドンを遺伝子中に人為的に導入してもかまわない。

このようにして調製した遺伝子のバキュロウイルスを用いた発現法も公知の方法を適宜応用することにより実施することができる。すなわち、バキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に調製した上記の遺伝子を挿入して組換え型バキュロウイルスを作製し、これを発現ウイルスベクターとして使用する。

- 10 組換え型バキュロウイルスを調製する際に使用するウイルスは、バキュロウイルスに分類されるものであればいずれのものであってもよい。具体的には、オートグラフ・カルフォルニカ (*Autographa Californica*、ATCC VR-1344 以下AcNPVと略す)、
- 15 ボンビックス・モリ (*Bombyx mori*) などの核多角体病ウイルスが好適である。

- バキュロウイルスは長鎖のウイルスDNA (たとえば、AcNPVのウイルスDNAは130Kbもある) を有し、発現したい遺伝子を発現制御領域 (プロモーターなど) の下流に直接挿入して発現ウイルスベクターを構築するのは不可能である。そこで、手順としては、まず遺伝子発現制御領域を含むウイルスDNA断片を切り出し、
- 20 これを大腸菌などを宿主とするプラスミドにクローニングしてトランスファー (転移) ベクターを調製する。次に、この転移ベクターに発現目的とする遺伝子を含む
- 25

DNA断片をバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下の適当な箇所に挿入し、これを野生型バキュロウイルスDNAと共に昆虫細胞にコートランスフェクトし、相同的組み換えによって目的とするドメインを含む遺伝子が
5 バキュロウイルス遺伝子の発現制御領域下に挿入されている組換え型バキュロウイルスを調製する。

組換え型バキュロウイルスを調製するのに使用する転移ベクターは、少なくとも相同的組換えのための領域、遺伝子発現制御領域およびクローニングサイトをその構成要素として含有する。
10

相同的組換えのための領域としては、相同的組換えを起こす機能を有するものであれば制限されない。通常はバキュロウイルスのDNA配列の一部またはそれに相当するものが使用され、特に他のDNA断片の挿入により不活化されてもウイルスの増殖に影響を及ぼさない領域のものが好ましい。このようなバキュロウイルスの増殖に非必須なDNA領域としては、たとえばポリヘドリン遺伝子 (science, 219, 715-721(1983)) の領域などを例示することができ、このポリヘドリン遺伝子領域を
15 相同的組換えを起こすように、たとえば、クローニングサイトの両側に配置する。

遺伝子発現制御領域としては、組換え型バキュロウイルスを昆虫細胞に感染させた時に目的の遺伝子を発現させることのできるものであれば特に限定されない。たとえば、バキュロウイルスのポリヘドリン蛋白をコードす
25

る遺伝子のプロモーター、10Xポリペプチドをコードする遺伝子のプロモーター、basic protein のプロモーターなどの各種プロモーターを含有する領域を使用することができる。遺伝子発現制御領域としてポリヘドリン

5 遺伝子のプロモーターを用いる場合、発現量をより高くするために開始コドンの一部を含むその上流の5' 非翻訳領域を完全に残し、更に3' 側のポリヘドリン遺伝子の余剰な部分を全て取り除いた形で使用するのが好ましい (J. Gen. Virol., 68, 1233-1250(1987), 特開平1-2

10 85198号)。

クローニングサイトは、プロモーターなどの遺伝子発現制御領域の下流の適当な箇所に発現目的のDNA断片を挿入するためのものであり、たとえば、制限酵素認識配列を含む適当なリンカーを常法にしたがって遺伝子発

15 現制御領域の下流の適当な箇所に配置すればよい。

このような条件を満足する転移ベクターとしては、たとえば pAc373、pAcYM1などが例示でき、特に pAcYM1 が好適である。これらの転移ベクターはいずれも公知の方法にしたがって調製することができる

20 (たとえば、特開平1-285198号公報、Mol. Cell. Biol., 3, 2156(1983)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 8404(1985)、Nature, 315, 592(1985)、J. Gen. Virol., 68, 1233-1250 (1987)、Bio/Technology, 6, 47 (1988)、実験医学、第7巻、146頁(1989))。

25 このような転移ベクターに上記のPCR法にて調製し

た遺伝子を挿入し、この転移ベクターDNAと野生型バ
キュロウイルスDNAとを昆虫細胞にコートランスフェ
クトし、相同的組み換えによって発現目的のドメインを
を含む遺伝子がバキュロウイルス遺伝子の発現制御領域
5 下に挿入されている組換え型バキュロウイルスをスクリ
ーニングする。

野生型バキュロウイルスとしては、転移ベクターを調
製する際に使用したウイルスと同じものを使用すればよ
く、ウイルスからのDNAの調製は常法により行うこと
10 ができる。また、組換え型ウイルスの選別を簡易にする
ため、ウイルスDNAの組換え箇所に β -ガラクトシダ
ーゼをコードするlacZ遺伝子を挿入しておくことが
好ましい。このようなlacZ遺伝子を挿入したウイル
スDNAは既に市販されているので（ファーマーミンジェン
15 社などから発売されている）、それを使用してもかまわ
ない。

ウイルスDNA及び転移ベクターDNAを感染させる
細胞としては、使用するウイルスに応じて適宜選定して
使用する。たとえば、ウイルスとしてAcNPVを使用
20 する場合、感染させる細胞としてはスポドプテラ・フル
ギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞などの夜盗蛾
由来の細胞を使用することができる。

コートランスフェクション及び組換え型バキュロウイル
スのスクリーニングは常法に従って操作することがで
25 きる（たとえば、Texas Agricultural Experiment

Station Bulletin No1555 Texas A&M University(1987)、
特開昭 6 0 - 3 7 9 8 8 号、特開昭 6 1 - 5 7 8 7 号参
照)。

上記のようにして調製した組換え型バキュロウイルス
5 を昆虫細胞に感染させ、これを培養し、培養物中から目
的とするポリペプチド(タンパク質)を採取する。

組換え型バキュロウイルスを感染させる細胞としては、
組換え型バキュロウイルスが増殖可能なものであれば特
に制限されない。たとえば、AcNPVを基に組換え型
10 バキュロウイルスを作製した場合、組換え型ウイルスを
感染させる細胞としてはスポドプテラ・フルギペルダ
(*Spodoptera frugiperda*) 細胞などの夜盗蛾由来の細
胞が好ましい。

細胞を培養する培地としては、グレース培地、SF-
15 9 0 0 培地、イーエックスセル 4 0 0 培地などの昆虫細
胞の培養に常用されているものを使用すればよい。また、
血清を含有したもの、血清を含有していないもののい
ずれも使用可能であるが、目的とするポリペプチドの精製
を容易にするため、培養当初から無血清培地を使用する
20 か、培養初期は血清含有培地を使用し、培養 2.4 時間頃
に無血清培地に切り替えるのが好ましい。

組換え型バキュロウイルスを感染させた細胞の培養は、
常法によって行うことができ、たとえば、20～30℃
でポリペプチドが充分に発現される時間(60～72時
25 間程度)培養すればよい。

培養物から目的とするポリペプチドの採取は蛋白の精製法として常用されている方法を適宜組み合わせることにより実施することができる。その中でも特に、抗 $\beta 2$ -G P I抗体またはカルジオリピンなどのリン脂質を用いるアフィニティークロマトグラフィー法が効果的である。

本発明の方法1は、このようにして得られた $\beta 2$ -G P I中のドメインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドと担体にリン脂質を結合させた固相試薬とを使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬とポリペプチドを使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、反応様式による分類としては競合反応法と非競合反応法が知られているが、本発明においてはいずれの方法も採用できる。また、検出方法による分類としては抗原抗体反応の結果を直接検出する非標識法（ネフエロメトリーなど）となんらかのマーカーを使用して検出する標識法が知られているが、本発明はどちらの方法であってもよい。さらに、B F分離を行う必要のあるヘテロジニアス法と必要のないホモジニアス法が知られており、本発明にはいずれの方法を適用してもよい。すなわち、これら公知の一般法の中から本発明の測定法の目的に適合する方法を適宜選択すればよい。

なお、一般的方法の詳細については、たとえば以下の文献に詳細に記載されている。

25 ①入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」（株）講談社、

昭和54年5月1日発行

②石川栄治ら編「酵素免疫測定法(第2版)」(株)医学書院、1982年12月15日発行

③臨床病理 臨時増刊 特集第53号「臨床検査のための
5 イムノアッセイ技術と応用」臨床病理刊行会、
1983年発行

④「バイオテクノロジー事典」(株)シーエムシー、
1986年10月9日発行

⑤「Methods in ENZYMOLOGY Vol.70」(Immunochemical
10 techniques (Part A))

⑥「Methods in ENZYMOLOGY Vol.73」(Immunochemical
techniques (Part B))

⑦「Methods in ENZYMOLOGY Vol.74」(Immunochemical
techniques (Part C))

15 ⑧「Methods in ENZYMOLOGY Vol.84」(Immunochemical
techniques (Part D:Selected Immunoassay))

⑨「Methods in ENZYMOLOGY Vol.92」(Immunochemical
techniques (Part E:Monoclonal Antibodies and
General Immunoassay Methods))

20 (⑤～⑨はアカデミックプレス社発行)

たとえば、ELISA法を例に挙げ、本発明の方法1
を具体的に説明すれば、まず、リン脂質を結合させたブ
レートの各ウェルに β 2-GPI中のドメインIVとドメ
インVと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを
25 反応させ、次に被検試料(たとえば、血液、血清など)

を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を反応させる。
次に、ウェルを洗浄後、酵素標識抗免疫グロブリン抗体
(たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗IgG抗体など)
を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に
5 基質(ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及
びテトラメチルベンチジンなど)を添加し、いずれかの
相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成し
ておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗
体の量を算出すればよい。なお、反応に使用するポリペ
10 プチドは、被検液と同時に反応させても構わない。

本発明の方法1を実施するためのキットも、上述の担
体にリン脂質を結合させた固相試薬と β 2-GPI中のド
メインIVとドメインVと同一のアミノ酸配列を含有す
るポリペプチドを構成試薬として包含することを特徴と
15 しており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致す
るように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記ELISA法を実施するためのキット
は下記の試薬から構成される。

- ①担体にリン脂質を結合させた固相試薬
- 20 ② β 2-GPI中のドメインIVとドメインVと同一の
アミノ酸配列を含有するポリペプチド
- ③酵素標識抗免疫グロブリン抗体
- ④基質溶液
- ⑤既知濃度の標準抗体液

25 (2)本発明の方法2及びそれに使用するキット

本発明の方法 2 は、抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメイン I V を中心とする構造であり、自己抗体の測定には必ずしもドメイン V は必要でないという知見を利用したものであり、 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを担体に結合させた固相試薬を使用することを特徴とする方法である。

10 方法 2 に使用するポリペプチドは、 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドであり、該ポリペプチドにおける $\beta 2$ -G P I
15 とは、哺乳動物由来の $\beta 2$ -G P I を例示することができ、特に第 1 図に示されるヒト $\beta 2$ -G P I を好適なものとして使用することができる。

このようなポリペプチドは、前述の本発明の方法 1 と同様に、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain
20 reaction; P C R 法）を用いてヒト $\beta 2$ -G P I 中の必要なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させ、目的とするポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により
25 取得することができる。

ポリペプチドを結合させる担体としては、上記ポリペプチドを結合できるものであれば特に限定されない。具体的には、ポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、スチレンー無水マレイン酸
5 共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂を例示することができる。

また、上記担体は、極性基をその表面に導入したものであっても構わない。ここで、極性基としては、水酸基、
10 カルボキシ基、カルボニル基、ホルミル基、イミノ基、酸素ラジカルなどの酸素原子に由来するものが好ましい。

このような担体は、タンパク質の吸着性の高い疎水性表面を有する合成樹脂、より具体的にはポリ塩化ビニル、ポリスチレン、スチレンージビニルベンゼン共重合体、
15 スチレンー無水マレイン酸共重合体、ナイロン、ポリアクリルアミド、ポリアクリロニトリル、ポリプロピレン、ポリメチレンメタクリレートなどの合成樹脂に、極性基を常法により化学的に導入することにより調製することができる。また、上記の疎水表面を有する合成樹脂に紫
20 外線、放射線（ α 線、 β 線、 γ 線など）、荷電粒子（プロトン、 α 粒子など）などを照射する方法、または上記の疎水表面を有する合成樹脂をオゾンで処理する方法によっても上記担体を調製することができる。

このような極性基をその表面に導入した担体の具体例
25 としては、EBプレート（ラボシステムズ社製）、Hタ

イブプレート、Cタイププレート（住友ベークライト社製）、マキシソーププレート（ヌンク社製）などを例示することができる。

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、
5 ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じた適宜な形状の担体を選択すればよい。

ポリペプチドと担体との結合は、物理的吸着法、イオン
10 結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法2は、このようにして得られた、 β 2-GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリ
15 ペプチドを担体に結合させたものを固相試薬として使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬を使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、ELISA法を例に挙げ、本発明の方法2
20 を具体的に説明すれば、まず、 β 2-GPI中のドメインIVと同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメインVと同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた上記の固相プレートの各ウェルに被検試料（たとえば、血液、血清など）を添加し、ポリペプチド
25 と被検液中の抗体を反応させる。次に、ウェルを洗浄後、

酵素標識抗免疫グロブリン抗体（たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗 Ig G 抗体など）を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に基質（ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及びテトラメチルベンチジンなど）を添加し、いずれかの相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成しておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗体の量を算出すればよい。

本発明の方法 2 を実施するためのキットも、上述の $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた固相試薬を構成試薬として包含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記 E L I S A 法を実施するためのキットは下記の試薬から構成される。

① $\beta 2$ -G P I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチドを担体に結合させた固相試薬

② 酵素標識抗免疫グロブリン抗体

③ 基質溶液

④ 既知濃度の標準抗体液

(3) 本発明の方法 3 及びそれに使用するキット

本発明の方法 3 は、 $\beta 2$ -G P I 中のドメイン V にリン脂質との結合部位が存在すること、抗リン脂質抗体症候

群由来の自己抗体の認識するエピトープ（抗体認識部位）はドメインⅠⅤを中心とする構造であること、このエピトープは通常隠れているが、ドメインⅤがリン脂質など結合することにより構造変化を起こし、抗体が認識
5 できるようになること、及び極性基をその表面に導入した担体がリン脂質の代わりになり得るという知見を利用したものであり、 $\beta 2$ -G P I 中のドメインⅠⅤとドメインⅤと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペ
10 プチドを極性基をその表面に導入した担体に結合したものを固相試薬として使用することを特徴としている。

本発明の方法 3 で使用するポリペプチドは、 $\beta 2$ -G P I 中のドメインⅠⅤとドメインⅤと同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドであり、該ポリペプチドにおけ
15 る $\beta 2$ -G P I とは、哺乳動物由来の $\beta 2$ -G P I を例示することができ、特に図 1 に示されるヒト $\beta 2$ -G P I を好適なものとして使用することができる。

このようなポリペプチドは、前述の本発明の方法 1 と同様に、ポリメラーゼ鎖反応法（polymerase chain
20 reaction；PCR 法）を用いてヒト $\beta 2$ -G P I 中の必要なドメインを含有する遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させ、目的とするポリペプチド（タンパク質）を生産する方法により
25 取得することができる。

ポリペプチドを結合させる担体としては、前述したような極性基をその表面に導入したものであれば特に限定されない。

担体の形状は、平板状（マイクロタイタープレート、
5 ディスクなど）、粒子状（ビーズなど）、管状（試験管など）、繊維状、膜状、微粒子状（ラテックス粒子など）などが例示され、測定法に応じた適宜な形状の担体を選択すればよい。

ポリペプチドと担体との結合は、物理的吸着法、イオン
10 結合法などの公知の方法から適宜選択して行えばよく、特に物理的吸着法が簡便な点で好ましい。

本発明の方法 3 は、このようにして得られた、 $\beta 2$ -GPI 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入
15 した担体に結合させたものを固相試薬として使用することを特徴としている。したがって、この固相試薬を使用する方法であれば、その測定原理・条件等は制限されない。

たとえば、ELISA 法を例に挙げ、本発明の方法 3
20 を具体的に説明すれば、まず、 $\beta 2$ -GPI 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相プレートの各ウェルに被検試料（たとえば、血液、血清など）を添加し、ポリペプチドと被検液中の抗体を
25 反応させる。

次に、ウェルを洗浄後、酵素標識抗免疫グロブリン抗体（たとえば、ペルオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体など）を反応させ、固相と液相を分離する。固相または液相に基質（ペルオキシダーゼの場合、たとえば過酸化水素及びテトラメチルベンチジンなど）を添加し、いずれかの相に含まれる酵素活性を測定する。最後に、予め作成しておいた検量線に基づき、得られた測定値に対応する抗体の量を算出すればよい。

本発明の方法 3 を実施するためのキットも、上述の $\beta 2$ -GPI 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相試薬を構成試薬として包含することを特徴としており、その他の構成試薬は採用した測定法に合致するように適宜組み合わせればよい。

たとえば、上記 ELISA 法を実施するためのキットは下記の試薬から構成される。

① $\beta 2$ -GPI 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを極性基をその表面に導入した担体に結合させた固相試薬

② 酵素標識抗免疫グロブリン抗体

③ 基質溶液

④ 既知濃度の標準抗体液

実施例

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

(1) C 末端側からのドメイン欠失遺伝子の作製

ポリメラーゼ鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いて様々なドメインを欠失させたヒト $\beta 2$ -GPI の遺伝子を合成し、合成した遺伝子をバキュロウィルスへ組み込んで組換えウィルスを作製し、この組換えウィルスを昆虫細胞へ感染させて目的のドメイン欠失変異蛋白を生産させた。

5 番目のドメイン (ドメイン V) を欠失した遺伝子の作製のため、まず PCR に用いるプライマーを設計する。本実施例においては、鋳型として用いたヒト $\beta 2$ -GPI 10 遺伝子はバキュロウィルス発現系で組換えウィルスの作製で用いる転移ベクター (pAcYM1) の BamHI 部位に挿入されているため、ヒト $\beta 2$ -GPI 遺伝子の 5' 非翻訳領域の上流に位置し、転移ベクター内に存在するポリヘドリン開始コドンのすぐ上流の配列を 5' プライマーとして用いた。

この結果、5' プライマーの配列は下記のとおりとなり、PCR で増幅された DNA 断片の片側 (目的の遺伝子の 5' 側) に BamHI 部位を設ける事ができる。

5'-GTAAT AAAAA AACCT ATAAA T-3'

20 また、ヒト $\beta 2$ -GPI は第 1 図に示すように、ドメイン分子内の二つの S-S 結合 (ドメイン V のみ三つ) によって巻き寿司様の二次構造を形成しており、ドメインの単位は二つの S-S 結合ごとに区切ることができる。それで、3' プライマーの設計は、ドメイン IV の末端 25 部分からドメイン V の頭までの配列に相補的な配列、塩

基配列から見れば、開始コドン A T G の A を + 1 とした場合、+ 7 6 3 から + 7 9 2 までの 3 0 個の塩基に相補的な配列を利用した。さらに、ドメイン I V の最後のシステインの後に終止コドンを入れて該コドンで翻訳が停止するようにするとともに、得られた遺伝子を転移ベクター等にクローン化しやすいように終止コドンのすぐ下流に E c o R I 部位を設けた。この結果、3' プライマーの配列は下記のとおりとなり、P C R によって増幅された D N A 断片は B a m H I と E c o R I によって切り出すことができる。

5' -ACAGA ATTCT TAACA ACTTG GCATG GCAGA-3'

次に、化学合成した上記の 2 つのプライマーを鋳型として、 β 2-G P I 遺伝子を組み込んだ p A c Y M 1 を用いて P C R を行った。P C R を行うためのキットは市販されており (GeneAmpTM PCR Reagent Kit with AmpliTaqTM DNA polymerase, 宝酒造販売、ホフマンローロッシュ社製造)、P C R の具体的操作はそのキットに添付している説明書に従って行った。

この様にして増幅された D N A 断片は、0.9% の濃度のアガロース電気泳動により分離し、D N A 断片を含むアガロース部分を回収、精製した。アガロースから目的の D N A 断片を回収する方法としては、そのアガロース断片を一度凍らせた後に融解し、滲み出てくる水溶液を回収する方法によっても行うことができる。また、このためのキットも幾つか市販されており (DNACELL、

章野科学器械製作所製造、第一化学薬品（株）販売、
GENECLEAN II、フナコシ（株）販売）、該キットを利用
して目的のDNA断片を回収、精製することもできる。

通常、PCRによって増幅されたDNA断片の末端は
5 平滑ではなく、5'側にAが突出しているため、T4
DNAポリメラーゼを使用したキット（DNA Blunting
Kit、宝酒造製造・販売）を用いて平滑化した。

平滑化されたDNA断片は、Sma I切断された
pUC118断片とライゲーション反応を行い、pUC
10 118のSma I部位に一旦クローニングした。ライゲ
ーション反応は、T4リガーゼを使用したキット（DNA
Ligation Kit、宝酒造製造・販売）を用いて行った。

この様にして増幅・クローンされたDNA断片をDI
-IV遺伝子（第2図）と呼ぶ。

15 用いる3'プライマーを替えることにより、上記と異
なるドメイン欠失遺伝子を作製する事ができる。たとえ
ば、3'プライマーとして+583から+612までの
配列を基にし、これに終止コドン及びEcoRI部位を
導入した下記の塩基配列を有する3'プライマーを用い
20 て、上記と同様の方法にてドメインIVとドメインVの
両ドメイン欠く遺伝子（DI-III遺伝子：第3図）
を作製した。

5'-TTTGA ATTCT CAGCA TTCTG GTAAT TTAGT-3'

（2）N末端側からのドメイン欠失遺伝子の作製

25 N末端側からのドメイン欠失遺伝子もC末端側からの

ドメイン欠失遺伝子の作製と同様の方法にて行うことができるが、N末側の遺伝子配列を単純に欠失させると分泌のためのリーダー配列も失ってしまう。よって、目的の蛋白を分泌発現させるためにリーダー配列をコードしているDNA断片とN末側のドメインを欠失している遺伝子断片とをアミノ酸の読みとり枠が一致するように連結する作業が必要である。

まず、リーダー配列をコードするDNA断片をPCRを用いて調製する。これは、C末側からのドメイン欠失遺伝子の作製と全く同様の作業によって行うことができる。すなわち、PCRに用いる5'プライマーは前記のものと同じものを用いた。また、3'プライマーはリーダー配列からドメインIにかけての領域(+49から+72)に相補的な配列を基にして、これにEcoRI部位を導入した下記の配列のものを用いた。

5'-GGGAG AATTC CGTCC TGCAA TAGC-3'

各プライマーを用いてPCRを行い、リーダー配列を含む断片を増幅した後、前述の方法で目的のDNA断片を精製し、pUC118へのクローニングを行った。

次に、N末側のドメインを欠失した遺伝子のPCRによる作製においては、鑄型として β 2-GPIのcDNAがpUC118にクローンされているものを用い、3'プライマーとしてマルチクローニングサイトのHindIII部位の外側の配列を有する下記のものを用いた。

通常、塩基配列の決定に良く使用されるM13プライマ

ーもしくはユニバーサルプライマー等も同様の領域の配列を用いており、それらを使用する事もできる。

5'-CCCAG TCACG ACGTT GTAAA-3'

5' プライマーは、各々欠失させるドメインからその次のドメインへかけての領域の配列を利用し、シグナル配列とアミノ酸の読みとり枠が一致するように EcoRI 部位を導入した。発現させたいドメインと 5' プライマーの塩基配列及び利用した塩基配列の位置は下記のとおりである。

10 ・ドメイン I を欠失する遺伝子 (D I I - V 遺伝子: 第 4 図)

5'-ACTCT GAATT CTACA CCCAG AGTAT GT-3' (+226 から +252 まで)

15 ・ドメイン I 及び I I を欠失する遺伝子 (D I I I - V 遺伝子: 第 5 図)

5'-GTCTG GAATT CCATC ATCTG CCCTC CA-3' (+406 から +432 まで)

・ドメイン I、I I 及び I I I を欠失する遺伝子 (D I V - V 遺伝子: 第 6 図)

20 5'-CCGAA TTCCA GGGAA GTAAA ATGCC CA-3' (+592 から +618 まで)

上記の 5' プライマー及び 3' プライマーを用いて PCR を行い、前述した方法と全く同様の操作で目的の DNA 断片を回収・精製して pUC118 へクローン化した。

25

(3) N末、C末両側のドメインを欠失した遺伝子の作製

D I I - V 遺伝子を鋳型として、C末側のドメインを欠失した遺伝子の作製方法と同様の操作を行う事により、
5 ドメイン I 及びドメイン V を欠失した遺伝子を作製した。
これは、後述の p V L D 2 5 を鋳型として、5' プライマー及び 3' プライマーは前述の D I I - V 遺伝子を作製した時と同一のものをを用いて P C R を行い作製した。
この遺伝子を D I I - I V 遺伝子と呼ぶ。

10 (4) 各欠失遺伝子の転移ベクターへの導入

各ドメイン欠失遺伝子をバキュロウィルスに導入して昆虫細胞において発現させるため、p U C 1 1 8 より目的遺伝子を切り出し、転移ベクター p V L 1 3 9 3 へクローンし直した。

15 すなわち、C末側のドメイン欠失遺伝子 (D I - I V 及び D I - I I I) の場合、B a m H I と E c o R I で切り出せるようにプライマーを設計してあるので、同制限酵素で切断し、目的の断片をアガロース電気泳動によって回収・精製した。そして、転移ベクターである
20 p V L 1 3 9 3 の B a m H I 部位と E c o R I 部位の間に挿入した。それぞれ作製した組換えプラスミドを p V L D 1 4 及び p V L D 1 3 と呼ぶ。

また、N末側からのドメインの欠失遺伝子 (D I I - V, D I I I - V 及び D I V - V) の場合、まずリーダー
25 一配列を含む断片を先に p V L 1 3 9 3 へ移した。すな

- わち、リーダー配列を含む断片はやはり B a m H I と E c o R I で切断できるように設計されているので、同断片として切り出し、p V L 1 3 9 3 の B a m H I - E c o R I 部位間に挿入した。このプラスミドを
- 5 p V L L S 1 と呼ぶ。次に、N 末側からのドメイン欠失遺伝子 (D I I - V, D I I I - V 及び D I V - V) は前述のように E c o R I と B a m H I で切断でき、E c o R I 部位でリーダー配列とアミノ酸の読みとり枠が一致するように設計されている。よって、E c o R I
- 10 と B a m H I で切り出し、アガロース電気泳動によって断片を回収・精製した後、p V L L S 1 の E c o R I 部位と B g 1 I I 部位の間に挿入した。この結果作製した組換えプラスミドをそれぞれ p V L D 2 5、p V L D 3 5 及び p V L D 4 5 と呼ぶ。
- 15 N 末及び C 末の両側のドメインを欠失した遺伝子 (D I I - I V) の場合はリーダー配列を含んだまま B a m H I で切り出せるので、同酵素で切断後、アガロース電気泳動によって目的の DNA 断片を回収・精製した。そして、p V L 1 3 9 3 の B a m H I 部位と B g 1
- 20 I I 部位の間に挿入した。この結果作製された組換えプラスミドを p V L D 2 4 と呼ぶ。
- これら p V L D 1 3, 1 4, 2 5, 3 5, 4 5, 2 4 をバキュロウィルス DNA とともに昆虫培養細胞 s f 9 (Spodoptera frugiperda cell: ファーミンジェン社な
- 25 どから入手可能) にコートランスフェクションを行った。

トランスフェクション後、3日目の培養上清からブ
ラクアッセイにより組換えウィルスを選択した。まず、培
養上清を10倍、100倍及び1000倍希釈し、これ
を直径35mmのディッシュに用意した 1×10^6 個の
5 昆虫細胞に接種した。1時間吸着させた後にウィルス液
を捨て、重層寒天培地を2ml加えた。この寒天培地は、
予め蒸留水で3%に溶かし滅菌した低融点寒天 (Sea
Plaque) を10% FCSを添加した培養液で1%に希釈
しておいたものである。重層した培地が固まった後、1
10 mlの培養液をさらに重層する。

27℃で3日間培養後、0.01%ニュートラルレ
ッド及び4% X-galを加えたPBSを1.0ml加え
て染色し、ブラクを判別し易くする。非組換えウィル
ス由来のブラクは β -ガラクトシダーゼの産生により
15 青色を呈するのに対し、組換えウィルスのブラクは β -
ガラクトシダーゼをコードしている遺伝子とドメイン
欠失遺伝子が組み換わっているために白色になる。組換
えウィルスと思われる白色のブラクをさらに3回ほど
ブラクアッセイを繰り返して、純化したクローンを得
20 た。この組換え型ウィルスをMultiplicity of
Infection (M. O. I.) = 10で 1×10^7 細胞の
sf細胞に感染させて、75ml容のプラスチック・
フラスコで72時間、10%のウシ胎児血清を含んだグ
レース培地で培養した。

25 培養後、培養液を5000xgの条件で遠心して培養

上清を得た。また、遠心により得られた細胞にPBSと電気泳動用緩衝液とをおのおの50 μ l加えて100℃で10分間加熱して細胞抽出液を調製した。培養上清及び細胞抽出液(各10 μ l)をSDS-PAGE(ポリ
5 アクリルアミドゲル電気泳動)処理に付し、泳動後クマシーブリリアントブルー(CBB)による染色及び抗 β 2-GPI抗血清を用いたウェスタンブロット法により β 2-GPIドメイン欠失変異蛋白の産生を確認した。

その結果、CBBによる染色分析において、試料とし
10 て β 2-GPIドメイン欠失遺伝子、DIV-V、DIII-V、DII-V、DI-III、DI-IVを挿入した各組換え型ウィルスの感染細胞から調製したものを使用した場合、分子量約20、35、38、30、38キロダルトンの移動度の箇所に野生型バキュロウィルス
15 の感染細胞から調製した試料では検出できない特異的なバンドが検出された。また、ウェスタンブロット法による分析により、抗 β 2-GPI抗血清はドメイン欠失遺伝子を挿入した組換え型ウィルスの感染細胞から調製した試料に特異的に出現したバンドにのみ反応することから、
20 これらの蛋白が、ドメイン欠失変異蛋白であることが確認された。

次に、組換え型ウィルスを昆虫細胞に感染させた後、一定時間毎に培養液を分取し、ドメイン欠失変異蛋白の産生の経時変化をウェスタンブロット法によって解析し
25 た。その結果、培養上清、細胞抽出液の何れも試料にお

いても培養開始 2.4 時間後にドメイン欠失変異蛋白の産生が確認でき、60～72 時間後が最も産生量が高かった。

(5) バキュロウィルスを用いて昆虫細胞で産生された

5 β 2-GPI ドメイン欠失変異蛋白の精製

組換えバキュロウィルスを感染させた昆虫細胞培養上清からの β 2-GPI ドメイン欠失変異蛋白の精製は、抗 β 2-GPI モノクロナール抗体を用いたアフィニティークラムにより行った。

10 すなわち、まずセファロース CL4B 樹脂 (ファルマシア社) 5 ml にマウス抗 β 2-GPI モノクロナール抗体 Cof 20 または Cof 23 (W092/19755) を 5 mg 結合させたアフィニティークラムを常法により調製した。そして、組換え型ウィルスを M. O. I. = 10
15 で 1×10^8 個の sf 細胞に感染させ、無血清培地 (SF-900、キブコ社製) を使用して 72 時間培養して得た上清 100 ml を、50 mM 塩化ナトリウム含有 10 mM リン酸緩衝液 (PBS、pH 7.4) 2 リットル (L) に対し一晩透析した後、同緩衝液にて平衡化
20 したアフィニティークラムにアプライし、蛋白を抗体に結合させた。この時、DIV-V の場合は Cof 23 を結合させたカラムを使用し、他のドメイン欠失蛋白 (DIII-V、DII-V、DI-III、DI-IV) では Cof 20 を結合させたカラムを使用した。

25 次に、充分量の同緩衝液でカラムを洗浄した後、1 M

グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.5) にて蛋白を溶出、回収した。回収した蛋白画分は、直ちに PBS (pH 7.4) 2 リットル (L) に対して一晩透析を行い、次に透析チューブと 40% ポリエチレングリコール (PEG) 5 溶液を用いた方法にて濃縮を行った。濃縮後、150 mM 塩化ナトリウム含有 HEPES 緩衝液 (pH 7.2) 2 L に対し一晩透析を行い、得られた蛋白を精製標品とした。

このような方法を用いて調製した各ドメイン欠失変異
 10 蛋白の精製標品は SDS-PAGE (クマシーブルー染色) にて分析した結果、純度 95% 以上という極めて高度に精製されたものであり (第 7 図)、作製した 2 種類
 のアフィニティーカラムクロマトグラフィー法が極めて効果的であることが明かとなった。また、SDS-PAGE
 15 GE 分析の結果から、各ドメイン欠失蛋白は表 1 に示す分子量であることが判明した。

表 1. 各ドメイン欠失蛋白の分子量

	分子量 (kDa)
DIV-V	18.9
DIII-V	32.7
DII-V	34.5
DI-II	25.6
DI-IV	36.4

(6) ドメイン欠失変異蛋白を用いた抗 β 2-GPIモノクローナル抗体の抗原決定基(epitope)の解析

得られた各種のドメイン欠失変異蛋白(DIV-V, DIII-V, DII-V, DI-III, DI-IV)ならびに全ドメインを有するリコンビナント蛋白(DI-V(whole))の各溶液($10\mu\text{g}/\text{ml}$)を $50\mu\text{l}$ /ウェルずつ96ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークライト社、Sプレート)の各ウェルに入れ、 4°C で一晩インキュベートした。 0.05% Tween 20含有リン酸緩衝生理食塩水(PBS-Tween: pH 7.4) ($200\mu\text{l}$)を用いて3回洗浄した後、 3% ゼラチン溶液($200\mu\text{l}$)を各ウェルに入れ、更に室温で1時間静置した。

ゼラチン液を除去した後、精製抗 β 2-GPIモノクローナル抗体(Cof-18, Cof-19, Cof-20, Cof-21, Cof-22, Cof-23)溶液($0.2\mu\text{g}/\text{ml}$)を $100\mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて1時間静置した。PBS-Tween ($200\mu\text{l}$)にて3回洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体を $100\mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて1時間静置した。上記と同様に洗浄の後、発色液(0.3mM テトレメチルベンジジン、 0.0003% H_2O_2) $100\mu\text{l}$ を加え、正確に10分反応させた。 2N H_2SO_4 、 $100\mu\text{l}$ を加えて反応を停止させ、 450nm の吸光度を測定した。

結果を第8図に示す。この結果をより、各精製抗 $\beta 2$ -GP Iモノクローナル抗体の抗原決定基を解析したのが第9図である。このように、ドメイン欠失変異蛋白を用いることにより、各抗 $\beta 2$ -GP I抗体の抗原決定基を容易に解析することができる。

(7) ドメイン欠失変異蛋白を用いたモノクローナル抗カルジオリピン抗体(抗CL抗体: WB-CAL-1: J. Immunol., 149, 1063-1068(1992))、および抗リン脂質抗体症候群患者血清中の自己抗体の抗原決定基

10 (epitope)の解析および自己抗体の検出

方法1;

全ドメインを有するリコンビナント $\beta 2$ -GP I蛋白(DI-V(whole))、ならびに得られた各種のドメイン欠失変異蛋白(DIV-V, DIII-V, DII-V, DI-III, DI-IV)の各溶液(10 μ g/
15 ml)を50 μ l/ウェルずつ96ウェルマイクロタイタープレート(住友ベークライト社、SプレートおよびCプレート)の各ウェルに入れ、4℃で一晩インキュベートした。なお、CプレートはSプレートの表面
20 に化学的にカルボキシル基を導入したものである。次に、PBS-Tween(200 μ l)にて3回洗浄した後、3%ゼラチン溶液、200 μ lを各ウェルに入れ、更に室温で1時間静置した。

ゼラチン液を除去した後、適宜希釈した精製モノクローナル抗カルジオリピン抗体(抗CL抗体: WB-

25

CAL-1) もしくは抗リン脂質抗体症候群患者の陽性血清を100 μ l ずつ入れ、室温にて1時間静置した。PBS-Tween (200 μ l) にて3回洗浄し、ペルオキシダーゼで標識された抗マウスIgG抗体もしくは抗ヒトIgG抗体を100 μ l ずつ入れ、室温にて1時間静置した。同様の洗浄の後、発色液(0.3 mM テトラメチルベンジジン、0.0003% H_2O_2) 100 μ l を加え、正確に10分反応させた。2N H_2SO_4 、100 μ l を加え、反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

精製モノクローナル抗カルジオリピン抗体(抗CL抗体)を用い、Sプレートでの測定結果を図10に、Cプレートの測定結果を第11図に示す。また、健常人血清4例、SLE患者血清3例、梅毒患者血清3例を用いて、Sプレートで測定した結果を図12~14に、Cプレートで測定した結果を第15~17図に示す。

その結果、カルボキシル基を導入していないプレート(S-プレート)に直接ドメイン欠失変異蛋白を抗原として固相化した場合、ドメインVを欠損したドメインIVを含むドメイン欠失変異蛋白で抗CL抗体が測定可能であることが明きらかとなった(第10図)。それに対し、カルボキシル基を導入したプレート(C-プレート)にドメイン欠失蛋白を固相化した場合、ヒト血清由来 β 2-GPIを固相化した時と同様にドメインIVおよびVを有するドメイン欠失変異蛋白で抗CL抗体が測定

可能であった（第 11 図）。なお、ドメイン V を欠失した蛋白である D I - I V でも、カルボキシル基を導入したプレート上で抗 C L 抗体を測定することが可能である（第 11 図）ことから、少なくともドメイン I V を有する変異蛋白が抗 C L 抗体の測定に有用であることが確認された。

また、ヒト血清を測定した場合、S L E 患者では抗 C L 抗体と同様の挙動を示した（第 16 図）。しかし、健常人および梅毒患者では特徴的な抗体の結合は見られなかった。

方法 2 ;

ウシ心臓由来のカルジオリピン（ $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ エタノール溶液）を $50 \mu\text{l}$ / ウエルずつ 96 ウエルマイクロタイタープレート（Immulon-1、Dynatech 社製）に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、全ドメインを有するリコンビナント $\beta 2\text{-GPI}$ 蛋白（D I - V (whole)）およびドメイン欠失蛋白（D I V - V, D I I I - V, D I I - V, D I - I I I, D I - I V）の各溶液（ $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）を $100 \mu\text{l}$ / ウエルずつ各ウエルに入れ、室温にて 1 時間静置した。洗浄後、適宜希釈した抗カルジオリピン抗体（抗 C L 抗体）を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ずつ加え、30 分反応させた。更に、洗浄し、ペルオキシダーゼで標識した抗マウス I g G 抗体もしくは抗ヒト I g G 抗体を $100 \mu\text{l}$ ずつ入れ、室温にて 1 時間静置した。同様に洗浄の後、発色

液 (0.3 mM テトラメチルベンジジン、0.0003 % H_2O_2) 100 μ l を加え、正確に 10 分反応させた。2N H_2SO_4 、100 μ l を加え、反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

- 5 その結果を第 18 図に示す。この結果、カルジオリピンを用いる ELISA (aCL-ELISA) の系に用いた場合、少なくともドメイン V とドメイン IV を含むドメイン欠失変異蛋白を使用することにより抗 CL 抗体の結合が認められた (第 18 図)。従って、aCL-
10 ELISA の系においては、ドメイン V とドメイン IV を含むドメイン欠失蛋白を用いることで抗 CL 抗体の検出が可能であることを確認した。

(8) $\beta 2$ -GPI のリン脂質 (カルジオリピン) 結合部位の解析

- 15 方法 1 ;

ウシ心臓由来のカルジオリピン (5.0 μ g/ml エタノール溶液) を 50 μ l / ウエルずつ 96 ウエルマイクロタイタープレート (Immulon-1、Dynatech 社製) に入れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、

- 20 全ドメインを有するリコンビナント $\beta 2$ -GPI 蛋白

(DI-V (whole)) およびドメイン欠失蛋白 (DIV-V, DIIV-V, DI-V, DI-III, DI-IV) の各溶液 (10 μ g/ml) を 100 μ l / ウエルずつ各ウエルに入れ、室温にて 1 時間静置した。洗

- 25 浄後、適宜希釈した抗 $\beta 2$ -GPI 抗体を 100 μ g /

m l ずつ加え、30分反応させた。更に、洗浄し、ペル
オキシダーゼで標識された抗マウス Ig G 抗体もしくは
ペルオキシダーゼで標識された抗ヒト Ig G 抗体を 10
0 μ l ずつ入れ、室温にて1時間静置した。同様の洗浄
5 の後、発色液（0.3 mM テトラメチルベンジジン、0.
0003% H_2O_2 ）100 μ l を加え、正確に10
分反応させた。2N H_2SO_4 、100 μ l を加え、
反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

結果を第19図に示す。その結果、ドメイン欠失変異
10 蛋白のうち、リン脂質（カルジオリピン）と結合し得た
のはドメインVを有する蛋白であった。

方法2；

ウシ心臓由来のカルジオリピン（50 μ g / m l エタ
ノール溶液）を50 μ l / ウエルずつ96ウエルマイク
15 ロタイタープレート（Immulon-1、Dynatech社製）に入
れ、減圧にて乾燥した。前述と同様の方法で洗浄した後、
インヒビターとして全ドメインを有するリコンビナント
 β 2-GPI 蛋白（DI-V (whole)）およびドメイン欠
失変異蛋白（DIV-V, DIII-V, DII-V,
20 DI-III, DI-IV）の各溶液（0-50 μ g
/ m l）を5 μ g / m l のビオチン化ヒト血清由来 β 2-
GPI（全量100 μ l / ウエル）と、室温にて1時間
インキュベートした。洗浄後、アビジン化ペルオキシダ
ーゼを100 μ l / ウエルずつ加え、15分反応させた。
25 洗浄の後、発色液（0.3 mM テトラメチルベンジジン、

0.0003% H_2O_2) 100 μ lを加え、正確に10分反応させた。2N H_2SO_4 、100 μ lを加え、反応を停止させ、450 nmの吸光度を測定した。

結果を第20図に示す。その結果、ドメインVを有するドメイン欠失蛋白がビオチン化ヒト血清由来 β 2-GPIのリン脂質に対する結合を強く阻害することが確認された。

以上の解析の結果、① β 2-GPIの第5ドメイン(ドメインV)にリン脂質との結合部位が存在すること、②抗リン脂質抗体症候群由来の自己抗体の認識するエピトープ(抗体認識部位)は第4ドメイン(ドメインIV)を中心とする構造であること、③このエピトープは通常隠れているが、ドメインVがリン脂質など結合することにより、構造変化を起こし、抗体が認識できるようになることが確認された。

産業上の利用可能性

β 2-GPI中の特定のドメインを含有するポリペプチドを使用することにより、感染症由来の抗カルジオリピン抗体の影響を受けることなく、抗リン脂質抗体症候群由来に自己抗体(抗カルジオリピン抗体)のみを特異的に測定することができるようになった。このような特徴は、従来法においては β 2-GPIの存在下及び非存在下の二種の条件下で測定を行うことにより初めてその分別定量が可能であったのに比べて、極めて有利である。

請求の範囲

1. β 2-グリコプロテイン I を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロテイン I の代わりに、 β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン IV と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。
- 10 2. β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン IV と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドをキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第 1 項記載の方法を実施するためのキット。
- 15 3. ポリペプチドが、ヒト由来の β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン IV と同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第 1 項記載の測定法または請求の範囲第 2 項記載のキット。
- 20 4. 担体にリン脂質を結合させた固相試薬と β 2-グリコプロテイン I を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロテイン I の代わりに、 β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン IV とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗
- 25

体の測定法。

5. β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチド、および担体にリン脂質を結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第 4 項記載の方法を実施するためのキット。

6. ポリペプチドが、ヒト由来の β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V 及びドメイン V と同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第 4 項記載の測定法または請求の範囲第 5 項記載のキット。

7. 担体に β 2-グリコプロテイン I を結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 β 2-グリコプロテイン I の代わりに、 β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。

8. β 2-グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたポリペプチド、またはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを担体に結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含むことを特徴とする、請求の範囲第 7 項記載の方法を実施するための

キット。

9. ポリペプチドが、ヒト由来の $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V と同一のアミノ酸配列を含有し、かつドメイン V と同一のアミノ酸配列を欠落させたものである、請求の範囲第 7 項記載の測定法または請求の範囲第 8 項記載のキット。

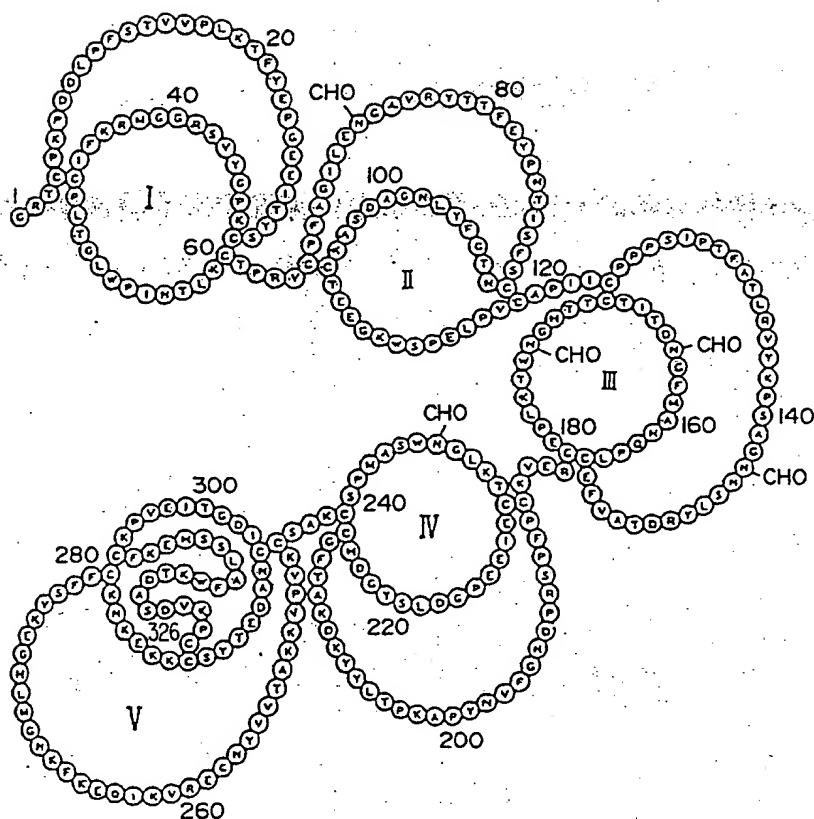
10. 極性基を表面に導入した担体に $\beta 2$ -グリコプロテイン I を結合させた固相試薬を利用してサンプル中の抗リン脂質抗体を測定する方法において、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I の代わりに、 $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと部分的に相違していても機能的に同等なポリペプチドを使用することを特徴とする、抗リン脂質抗体の測定法。

11. $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V とドメイン V と同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたはそれと相違していても機能的に同等なポリペプチドを極性基を表面に導入した担体に結合させた固相試薬をキットの構成試薬として含有することを特徴とする、請求の範囲第 10 項記載の方法を実施するためのキット。

12. ポリペプチドが、ヒト由来の $\beta 2$ -グリコプロテイン I 中のドメイン I V 及びドメイン V と同一のアミノ酸配列を含むものである、請求の範囲第 10 項記載の測定法または請求の範囲第 11 項記載のキット。

1/17

FIG. 1



2/17

FIG. 2

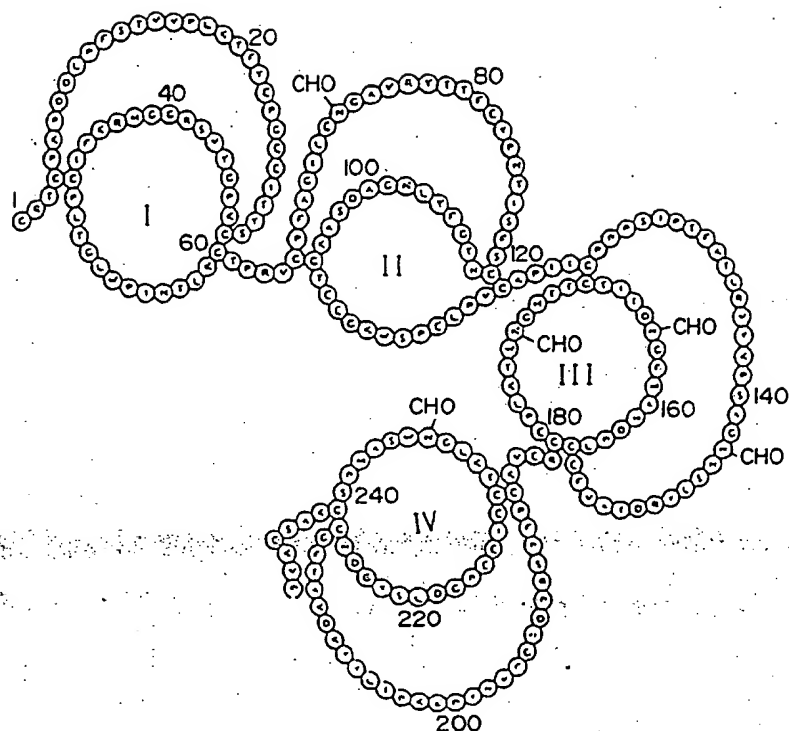
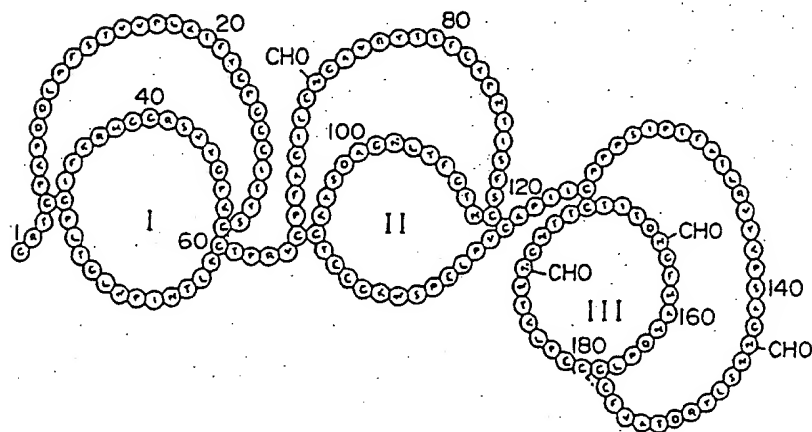


FIG. 3



3/17

FIG. 4

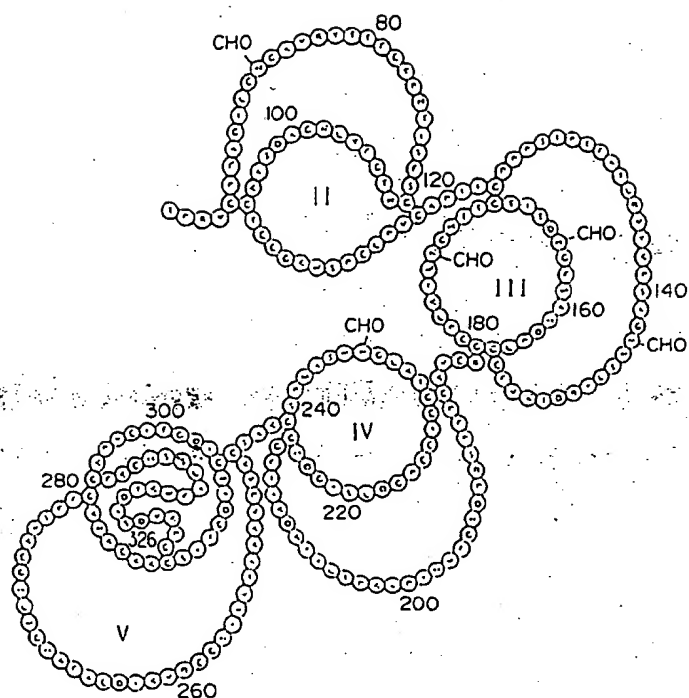
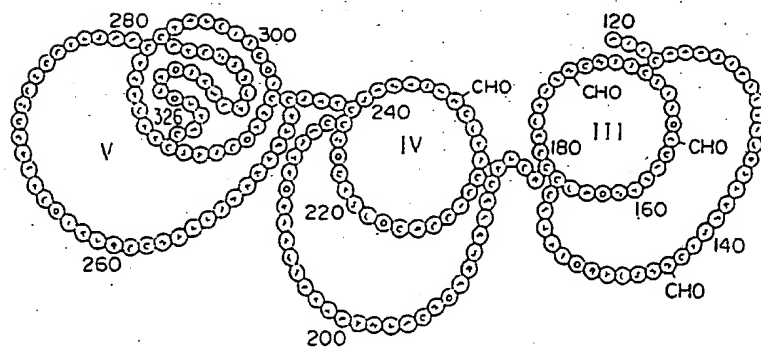
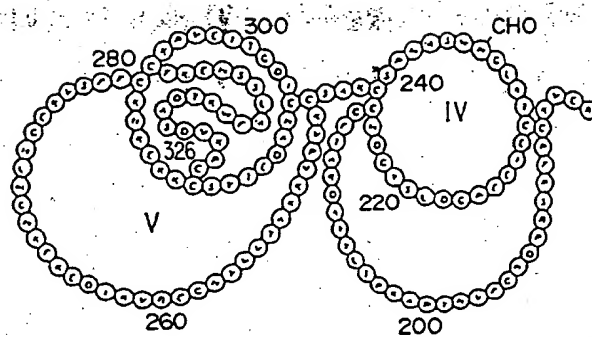


FIG. 5



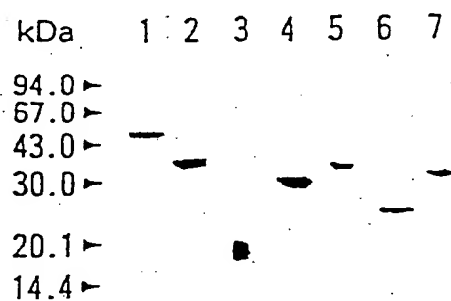
4/17

FIG. 6



5/17

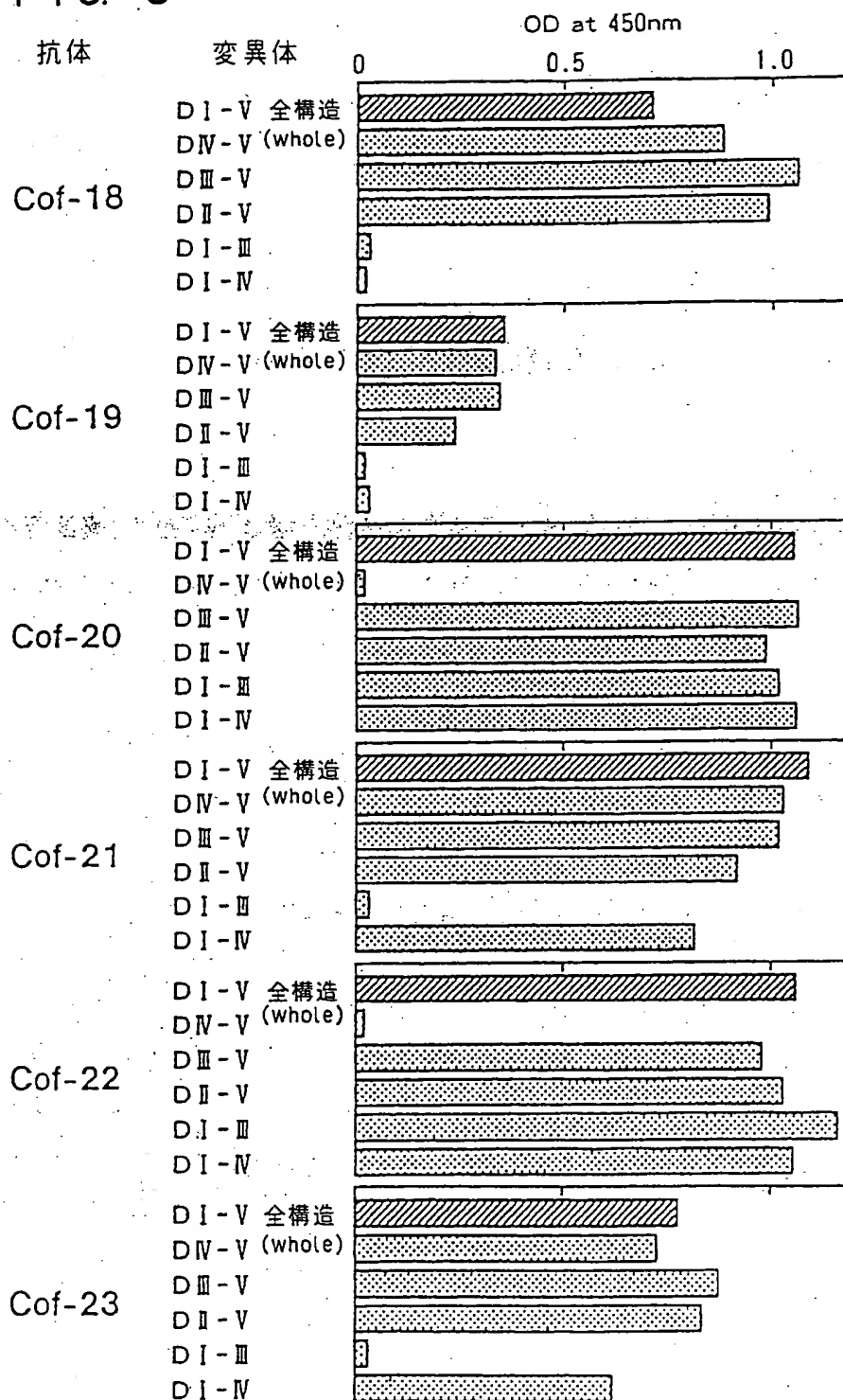
FIG. 7



- レーン 1; 血清由来 β_2 -GPI
2; リコンビナント β_2 -GPI
(D I - V, 全構造 (whole))
3; D IV - V
4; D III - V
5; D II - V
6; D I - III
7; D I - IV

6/17

FIG. 8



7/17

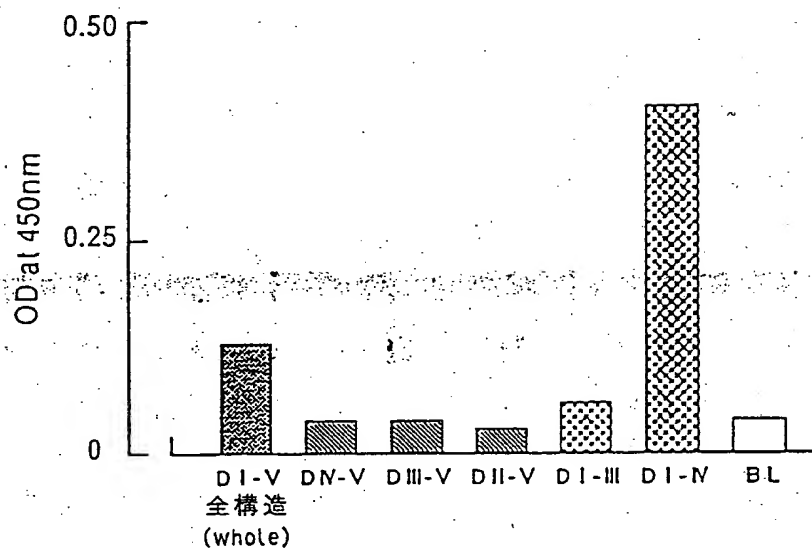
FIG. 9

	欠失変異蛋白				エピソード
	DIV-V	DIII-V	DII-V	DI-III	DI-IV
Cof-18	+	+	+	+	+
Cof-19	+	+	+	+	+
Cof-20	+	+	+	+	+
Cof-21	+	+	+	+	+
Cof-22	+	+	+	+	+
Cof-23	+	+	+	+	+

8/17

FIG. 10

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

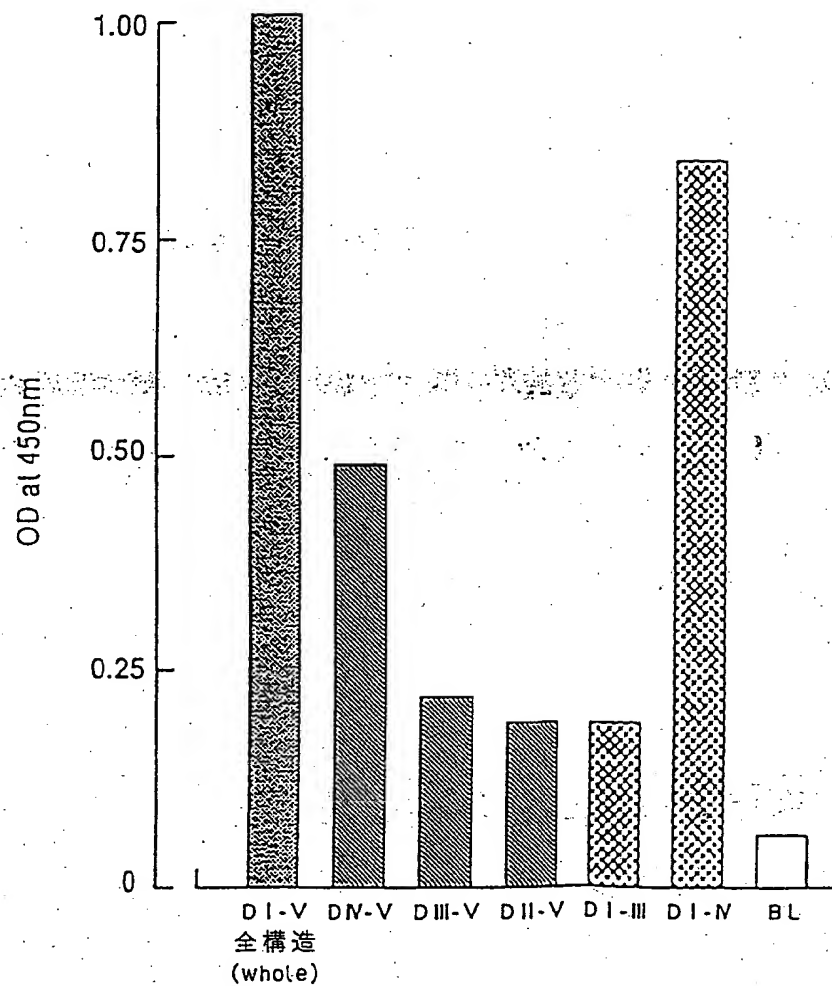


欠失変異蛋白

9/17

FIG. II

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)



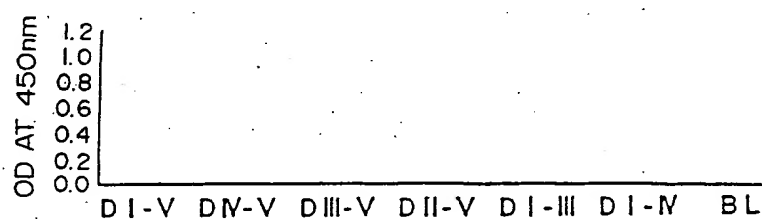
欠失変異蛋白

10/17

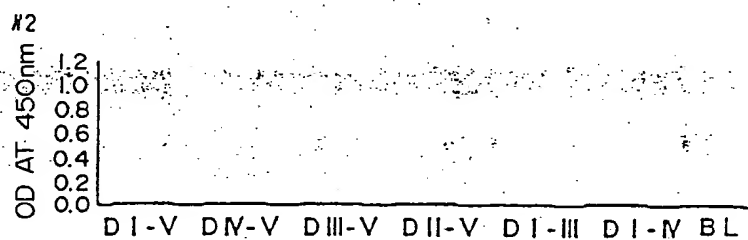
FIG. 12

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

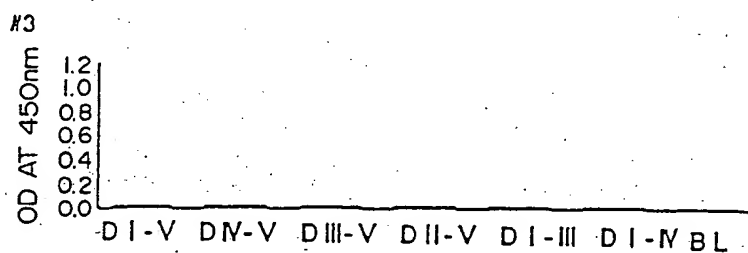
健康人 #1



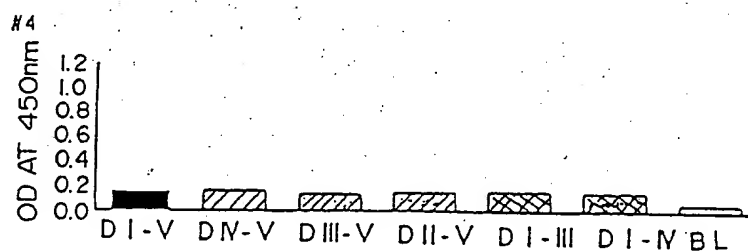
欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



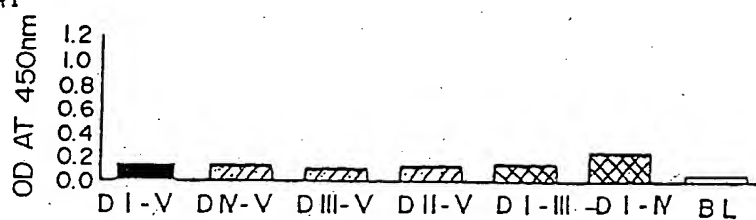
欠失変異蛋白

11/17

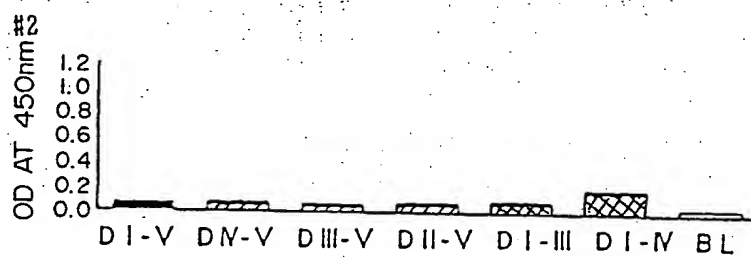
FIG. 13

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

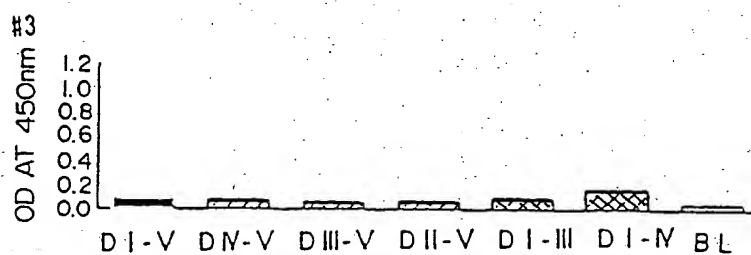
SLE #1



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



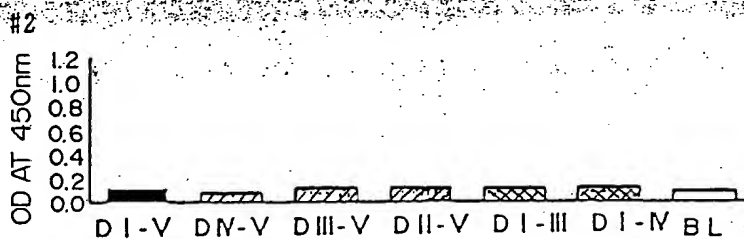
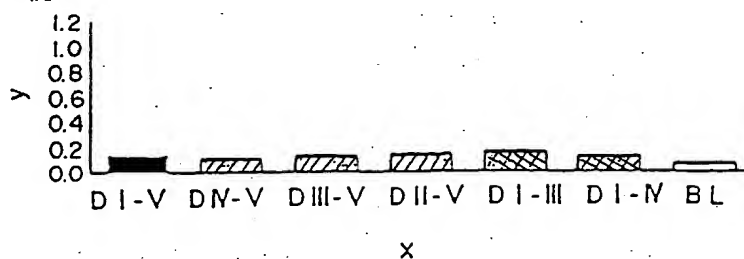
欠失変異蛋白

12/17

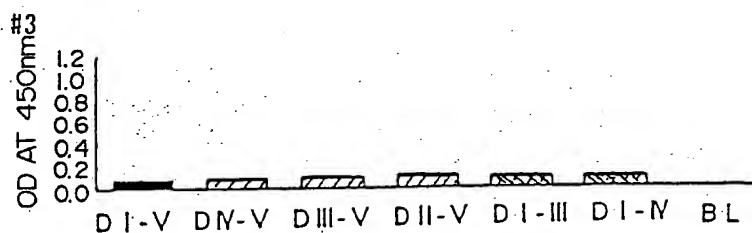
FIG. 14

酸素原子非導入のプレート
(Non-oxygenated plate)

梅毒患者 #1



欠失変異蛋白



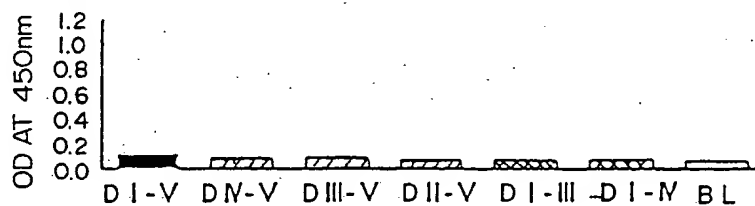
欠失変異蛋白

13/17

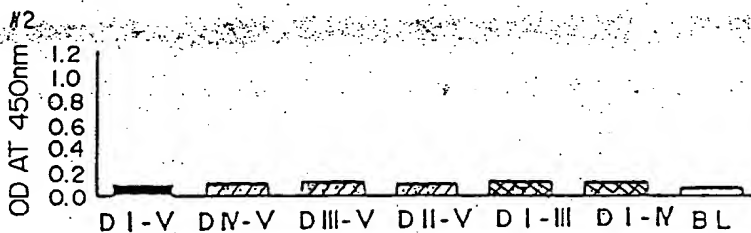
FIG. 15

酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

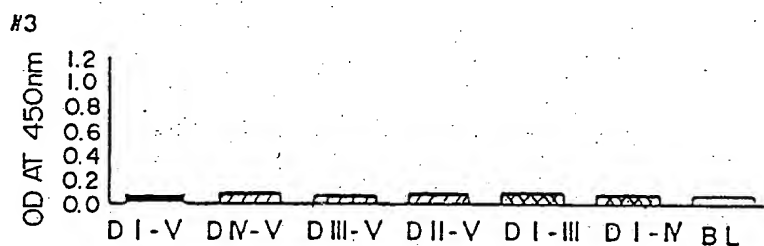
健康人 #1



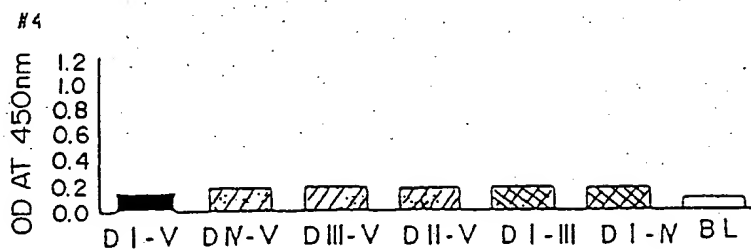
欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白



欠失変異蛋白

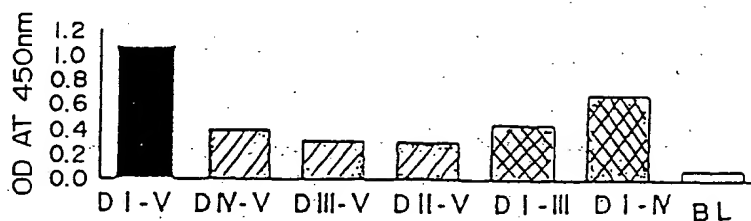
差替え用紙(規則26)

14/17

FIG. 16

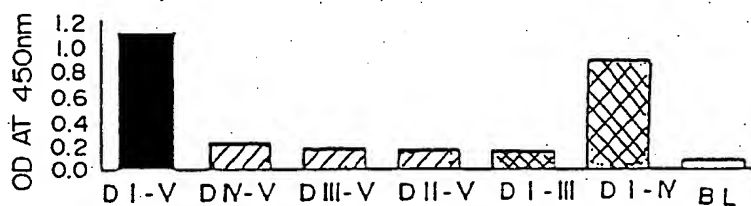
酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

SLE #1



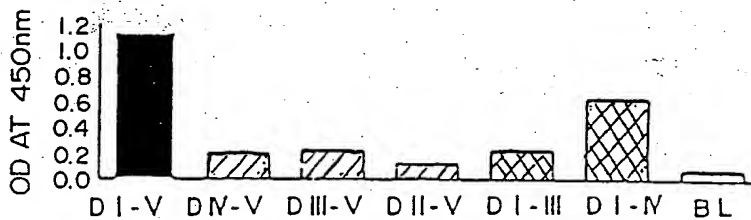
欠失変異蛋白

#2



欠失変異蛋白

#3



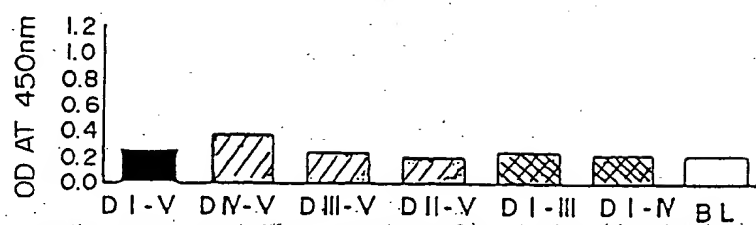
欠失変異蛋白

15/17

FIG. 17

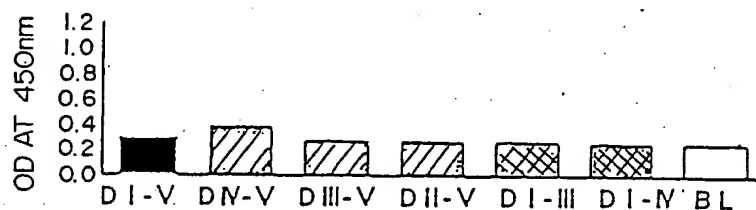
酸素原子非導入のプレート
(Poly-oxygenated plate)

梅毒患者 #1



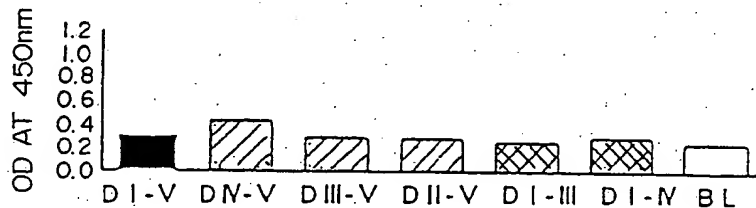
欠失変異蛋白

#2



欠失変異蛋白

#3



欠失変異蛋白

16/17

FIG. 18

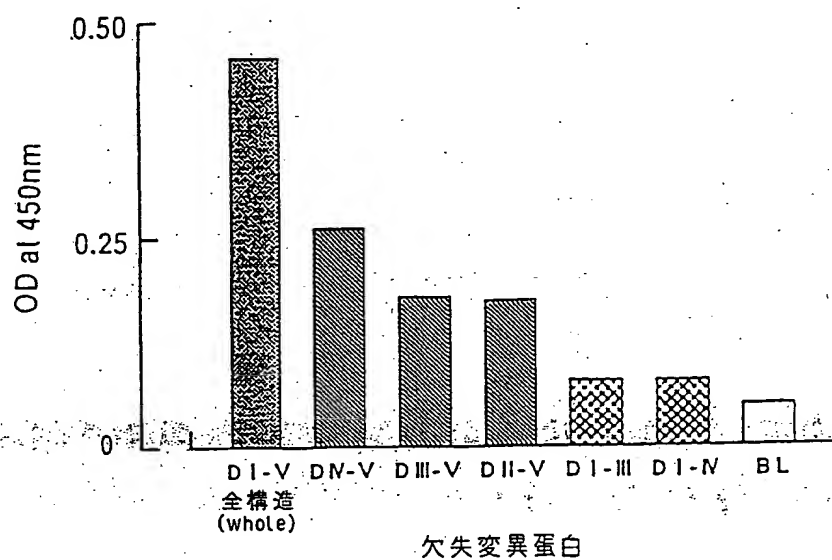
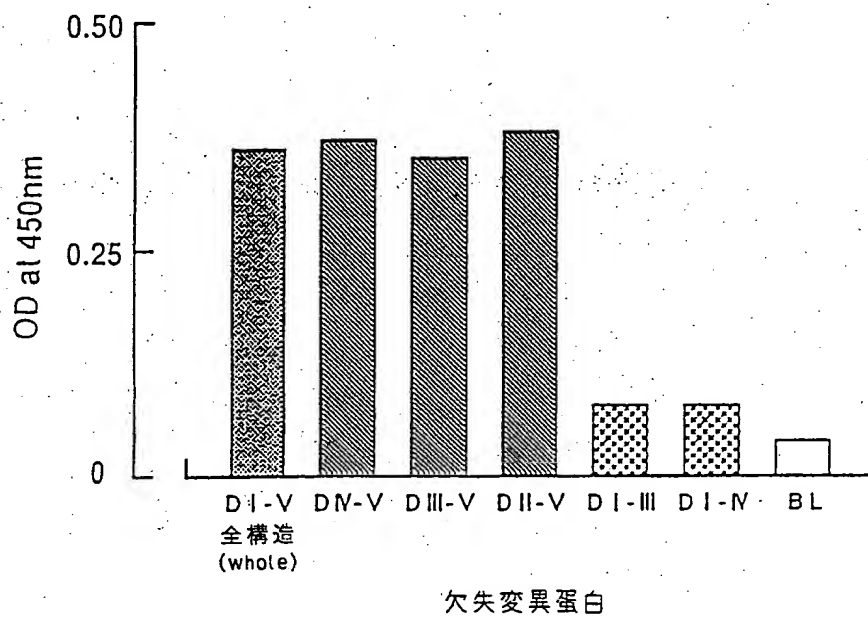
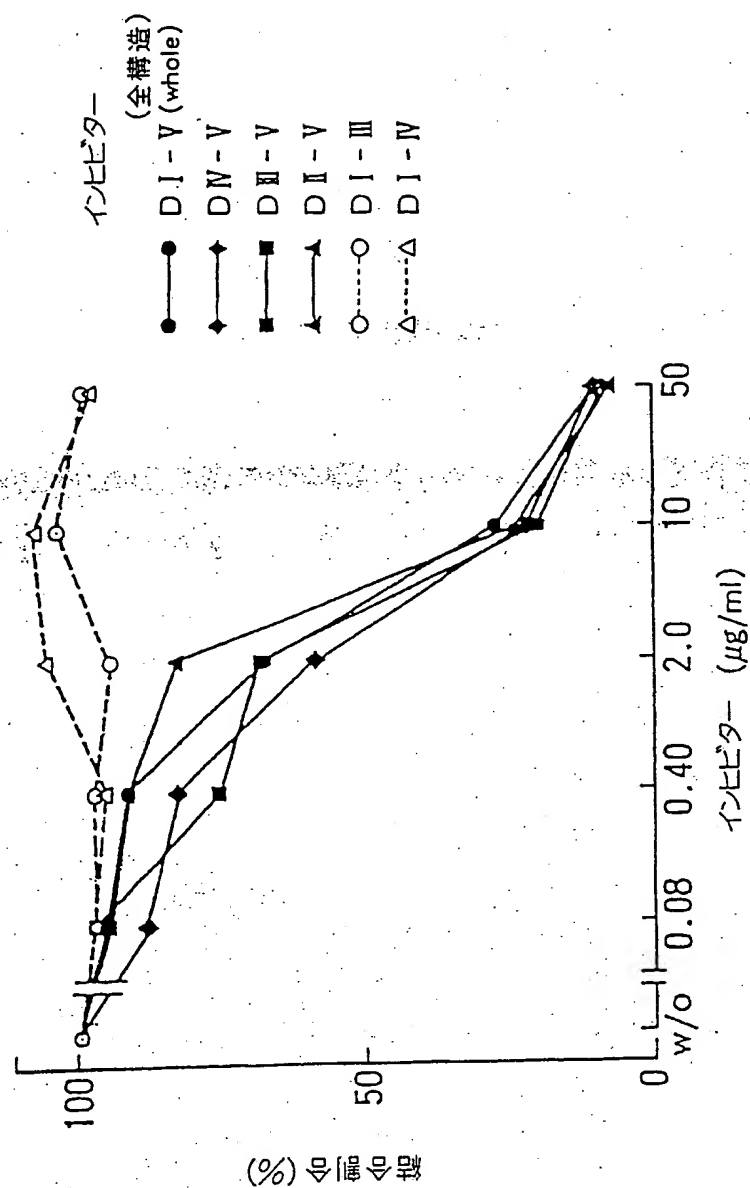


FIG. 19



17/17

FIG. 20



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP94/01929

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int. Cl ⁶ G01N33/564, 33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int. Cl ⁶ G01N33/564, 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Jitsuyo Shinan Koho 1926 - 1994		
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971 - 1994		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, A1, 93/16387 (Yamasa Corp.), August 19, 1993 (19. 08. 93),	1-12
A	WO, A1, 91/06006 (Yamasa Corp.), May 2, 1991 (02. 05. 91), &EP, A, 450099	1-12
A	JP, A, 4-506415 (Yamasa Corp.) November 5, 1992 (05. 11. 92), &WO, A, 91/15772	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
January 30, 1995 (30. 01. 95)		February 21, 1995 (21. 02. 95)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ G 01 N 33 / 5 6 4 , 3 3 / 5 3		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁸ G 01 N 33 / 5 6 4 , 3 3 / 5 3		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
日本国実用新案公報 1926-1994年		
日本国公開実用新案公報 1971-1994年		
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, A1, 93/16387 (ヤマサ醤油株式会社), 19. 8月. 1993 (19. 08. 93)	1-12
A	WO, A1, 91/06006 (ヤマサ醤油株式会社), 2. 5月. 1991 (02. 05. 91) & EP, A, 450099	1-12
A	JP, A, 4-506415 (ヤマサ醤油株式会社), 5. 11月. 1992 (05. 11. 92) & WO, A, 91/15772	1-12
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30. 01. 95	国際調査報告の発送日 21.02.95	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏 之	2 J 9 0 1 5
電話番号 03-3581-1101 内線		3252